

УДК 575.2 577.21

ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *ABAH*, *CYT-ICDH*, *P5CS*, *DREB2*, *DREB1*, *NAC034* ТОПОЛЯС. Г. Ржевский¹, Т. А. Гродецкая¹, Е. Ю. Аминаева¹, Т. П. Федулова¹,
А. М. Кондратьева¹, О. С. Машкина^{1,2}¹ ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
лесной генетики, селекции и биотехнологии»² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 08.10.2022 г.

Аннотация. Для решения задач селекции в лесном хозяйстве перспективно использование методов определения реакции растений на стрессовые условия на уровне генома. Удобным материалом для исследований в данном случае являются культивируемые *in vitro* микрорастения. В данной статье представлены результаты оценки влияния солевого стресса на экспрессию генов белка, индуцируемого абсцизовой кислотой и обезвоживанием (*abaH*), изоцитратдегидрогеназы (*cyt-icdh*), дельта-1-пирролин-5-карбоксилатсинтетазы (*p5cs*), генов факторов транскрипции *DREB2*, *DREB1*, *NAC034* у культивируемых *in vitro* клонов тополя. Объектами исследования являлись образцы гибрида тополя белого и осины селекции А.П. Царева, тополя белого, триплоидного гибрида тополя белого селекции О.С. Машкиной, и тополя сереющего сорта «Приярский» селекции А.И. Сиволапова, подвергнутые засолению культуральной среды в условиях *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рассматриваемые гены, проанализированные на предмет экспрессии, могут служить маркерами ответа на воздействие солевого стресса. Установлено, что экспрессия гена *abaH* увеличивается у двух образцов, в то время как у третьего обнаружено снижение данного показателя относительно контроля, четвертый не показал изменений в экспрессии *abaH*. Для гена *cyt-icdh* показано увеличение экспрессии у опытных образцов для трех проанализированных генотипов, четвертый образец показал снижение относительного уровня транскриптов данного гена. Установлено, что экспрессия гена *DREB1* значительно увеличивается у образцов одного клона, но снижается у остальных. Относительный уровень транскриптов гена *DREB2* увеличивается у трех из проанализированных образцов тополя, у одного – снижается. Для гена *NAC034* также наблюдается увеличение уровня транскриптов для двух образцов генотипов тополя и уменьшение для двух остальных. Изменение относительного уровня транскриптов, задействованных в данном исследовании генов, у отдельных генотипов может являться следствием развития механизмов адаптации к воздействию солевого стресса. Анализ экспрессии данных генов может быть использован для оценки стрессоустойчивости различных генотипов и сортов тополя в совокупности с другими методами.

Ключевые слова: тополь, солевой стресс, экспрессия, *abaH*, *cyt-icdh*, *p5cs*, *DREB2*, *DREB1*, *NAC034*.

Лесное хозяйство нуждается в отборе и внедрении в практику лесовосстановления и лесоразведения древесных пород, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым воздействиям. Для осуществления селекции можно использовать сочетание традиционных методов, позволяющих наглядно оценивать физиологические параметры

растительных организмов, а также современных инновационных способов определения стрессовой реакции на уровне генома.

В настоящее время для изучения ответа генома растения на стресс осуществляется измерение экспрессии генов, отвечающих за ключевые метаболические функции. Подобные исследования были проведены для множества лесных древесных пород, в том числе для тополя [1, 2].

Представители рода *Populus* имеют широкое распространение в разных климатических зонах [3]. Помимо экологической значимости, они служат модельными объектами для исследования физиологических и молекулярных механизмов стрессоустойчивости деревьев. Удобным материалом для подобных экспериментов являются культивируемые *in vitro* микроклоны. Добавление в питательные среды солей позволяет моделировать не только солевой, но также и токсический стресс, для дальнейшего исследования их влияния на физиологические процессы растений [4, 5]. Хлорид натрия вызывает у растений токсическое действие избыточного содержания неорганических ионов натрия и хлора, ионный дисбаланс и окислительный стресс, в результате чего наблюдаются нарушение клеточного метаболизма и снижение продуктивности растений [6, 7].

В лаборатории биотехнологии ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» была разработана биотест-система на основе каллусных культур *in vitro* по определению засухоустойчивых форм сосны обыкновенной [8, 9]. Для тополя в ходе экспериментов было установлено, что NaCl в концентрации 1% позволяет разделять клоны по степени устойчивости к заданному стрессору [10].

Рассмотрим некоторые гены, используемые в качестве перспективных маркеров для оценки отклика растительного организма на абиотическое стрессовое воздействие.

1) Ген белка, индуцируемого абсцизовой кислотой и обезвоживанием (*abaH*). Абсцизовая кислота (АБК) – фитогормон, контролирующий многочисленные аспекты жизненного цикла растений, включая покой семян, прорастание и реакции на стрессовые условия окружающей среды. Воздействие абиотических факторов, например, таких как засуха, вызывает накопление абсцизовой кислоты, которая, в свою очередь, регулирует экспрессию других различных генов (АБК-зависимые пути регуляции транскрипции индуцируемых стрессом генов) [11, 12].

2) Ген изоцитратдегидрогеназы (*cyt-icdh*). Цитозольная НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (ИДГ) производит 2-оксоглутарат и НАДФН. Установлено, что фермент ИДГ играет роль в редокс-сигнализации и связан с ответом на воздействие факторов стресса, в частности – с регуляцией накопления в растительных тканях пролина, что является общим метаболическим ответом растений на воздействие солевого стресса [13, 14].

3) Ген дельта-1-пирролин-5-карбоксилат-синтетазы (*p5cs*). В условиях стресса важным протективным фактором в растительном организме является аминокислота пролин. Биосинтез пролина из глутамата состоит из двух ферментативных реакций с участием дельта-1-пирролин-5-карбоксилатредуктазы и дельта-1-пирролин-5-карбоксилатсинтетазы. Соответственно, экспрессия гена *p5cs* влияет на продукцию пролина и обеспечиваемые им защитные функции [15].

4) Гены семейства *DREB*. Белки семейства *DREB* (Dehydration Responsive Element Binding), являющиеся факторами транскрипции, также выполняют функции, связанные с защитой растений от стрессовых воздействий. Гены *DREB2*, *DREB1* и другие представители семейства управляют данными транскрипционными факторами [16]. Изменение экспрессии генов, кодирующих семейство белков *DREB2*, при воздействии солевого стресса было показано для тополя черного, в то время как семейство *DREB1* ассоциировалось с влиянием холодового стресса у различных растений [1]. По имеющимся данным, ген *PeDREB1A* (из *Phyllostachys edulis*) проявлял существенный отклик на холодовый стресс, но продемонстрировал лишь незначительную реакцию на засуху и солевой стресс [17, 18, 19].

5) Гены семейства *NAC*. Представители семейства *NAC* также регулируют процессы развития путем синтеза факторов транскрипции, и отвечают за реакцию на воздействие абиотического и биотического стресса. Показано, что экспрессия генов семейства *NAC* значительно увеличивалась при воздействии солевого стресса на растения арабидопсиса [20]. Также установлено, что сверхэкспрессия *PeNAC036* у арабидопсиса дикого типа и внедрение *PeNAC036* в мутантную линию *anac072* повышали устойчивость к засолению и засухе, в то время как сверхэкспрессия *PeNAC034* в растениях дикого типа и внедрение в мутантные линии *ataf1* увеличивали чувствительность растений к стрессу [2, 21].

Таким образом, выявление маркерных генов устойчивости растений к воздействию стрессовых факторов является актуальной задачей, направленной на решение вопроса отбора и размножения перспективных видов древесных растений для решения проблем производства и лесовосстановления.

Цель данной работы заключалась в проведении молекулярно-генетической оценки экспрессии генов *abaH*, *cyt-icdh*, *DREB1*, *DREB2* и

НАС034, ассоциированных с солеустойчивостью у микроклонов тополя в культуре *in vitro*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлись листья клонов тополя: 1/03 (гибрид тополя белого и осины селекции А.П. Царева), Е (тополь белый), Тг (триплоидные гибриды тополя белого селекции О.С. Машкиной), Тпр, (тополь сереющий сорт «Приярский» селекции А.И. Сиволапова) [22, 23].

Данные формы тополя являются быстрорастущими, высокопродуктивными, отличаются хорошим качеством древесины, являются перспективными для практического использования [24]. Белые тополя, представленные в Центрально-Черноземном районе двумя аутохтонными видами (тополь белый (*Populus alba* L.) и тополь сереющий (*P. canescens* Sm.)), по продуктивности древостоев, качеству древесины и другим признакам значительно превосходят тополя других видов [25, 26].

Эксперимент по моделированию солевого стресса в условиях *in vitro* включал следующие этапы:

1) Получение опытной партии микрорастений *in vitro* (на среде ½ WPM).

2) Моделирование солевого стресса (на ½ WPM с добавлением 1.0% NaCl). В ходе ранее проведенных экспериментов по испытанию различных концентраций NaCl в питательной среде (0.2%; 0.5%; 0.7%; 1.0%) с целью подбора оптимальной для дифференцировки культур тополя *in vitro* по отношению к заданному стрессору было показано, что на питательной среде с 0.2 и 0.5% NaCl отмечается незначительная разница в реакции культур, 0.7% NaCl тормозит рост большинства из них, однако после перенесения их на неселективную питательную среду рост возобновляется. Показано, что 1% содержание соли в питательной среде резко снижает сохранность микропобегов, при перенесении на ½ WPM рост возобновляется у единичных клонов. В связи с этим в дальнейших исследованиях с тополем использовалась сублетальная концентрация NaCl – 1.0%.

Режим культивирования имел следующие параметры: температура 25±2 °С, фотопериод – 16 ч, освещенность – 2.0 клк. Для испытанных клонов тополя лучшие результаты получены при жестком способе воздействия (1% NaCl). При резком снижении роста (0.7±0.1 см против 3.8±0.4 см в контроле) сохранность культур варьировала от 7.8±5.9 % до 40.0±5.3 % против 92.3±4.7 % в

контроле. Это позволило выделить относительно устойчивые клоны, показавшие идентичные результаты при повторном сублетальном воздействии стрессового фактора [10].

Микрочеренки исследуемых клонов трехкратно подвергались воздействию солевого стресса в культуре *in vitro* (½ WPM + 1% NaCl) в течение 3 недель, с чередованием их пребывания на неселективной питательной среде (½ WPM) в течение 3–4 недель. Контрольные образцы находились на среде ½ WPM без добавления соли [28, 29].

3) Отбор материала для анализа экспрессии генов осуществлялся через 15 недель после начала эксперимента по моделированию стрессового воздействия. Предполагается, что к данному сроку должны существенно проявиться метаболические изменения в подвергнутых стрессу растениях, в том числе на уровне генной экспрессии.

Контролем во всех экспериментах служили образцы исходных клонов в неселективных, стандартных условиях культивирования [27].

Выделение РНК из исследуемых образцов проводили модифицированным методом фенол-хлороформной экстракции [30].

Качественную оценку суммарной РНК осуществляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию РНК определяли на флюориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора реактивов Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Обратную транскрипцию проводили с помощью стандартного набора с MMLV-RN (Диаэм, Россия), используя 0.5–1 мкг суммарной РНК.

Подбор генов стрессоустойчивости для исследования проводили с использованием литературных источников [1, 2]. Подбор праймеров к генам устойчивости образцов тополя осуществляли на основе последовательностей, представленных в международной базе данных NCBI. Поиск общих для нескольких видов тополя участков мРНК осуществляли путем выравнивания нуклеотидных последовательностей исследуемых генов в программе Clustal Omega. Полученные последовательности использовали для подбора праймеров в программе Primer3. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Для оптимизации условий амплификации праймеров на матрицу кДНК проводили постановку ПЦР с температурным градиентом (58–70°C) на приборе C1000 (Bio-Rad, США). Оптимальной температурой отжига праймеров была установлена 60°C.

Таблица 1
Последовательности праймеров к генам стрессоустойчивости для образцов тополя

Название	Последовательность
<i>abaH</i>	F: CATGCATGAGAAGCACGAGT
	R: GGTGGTGCTTCTTTCCGTTA
<i>cyt-icdh</i>	F: ACTCGGCATTACAGGGTTC
	R: GACTCCACAGCTCCGATACA
<i>p5cs</i>	F: TCTATGGCCTGCACTGTTGA
	R: TGCTTATTCCGACCTCTGCA
<i>DREB1</i>	F: TTGAGGGGTAGGTCTGCTTG
	R: CCTCATCTCCCGTCTCATC
<i>DREB2</i>	F: TGTATGCTCGTATGCTCGT
	R: TCCTCATACACGCAGACCTC
<i>NAC034</i>	F: GTGTATTTTCGACACGTCAGATTCT
	R: ATACATGAACATGTCCTGAAGCG
<i>18S</i>	F: GGCTCTGCCCGTTGCTCT
	R: CGTCACCCGTCACCACCA

ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I в составе стандартной ПЦР-смеси (Синтол, Россия). Параметры амплификации были следующими: 95°C – 3 мин, затем 45 циклов из стадий 95°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 30 сек, завершающихся стадией 72°C – 2 мин. Относительный уровень транскриптов ис-

следуемых генов определялся с применением 2- $\Delta\Delta C_t$ -метода с использованием программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad, США) на основании трех аналитических повторностей [31]. Статистическое сравнение опытных и контрольных образцов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Погрешность рассчитывали как стандартную ошибку среднего (Standard Error of Mean, SEM), расчеты проводились в программе Microsoft Excel.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования установлено, что экспрессия гена *abaH* увеличивается у образцов Е и 1/03, в то время как у клона Тг обнаружено снижение данного показателя относительно контрольных образцов. У экземпляра тополя Тпр не наблюдается изменений в экспрессии *abaH* (рисунок 1). Для гена цитозольной изоцитратдегидрогеназы (*cyt-icdh*) показано увеличение экспрессии у опытных образцов для трех из четырех проанализированных генотипов. Образцы тополя Тг показали снижение относительного уровня транскриптов данного гена.

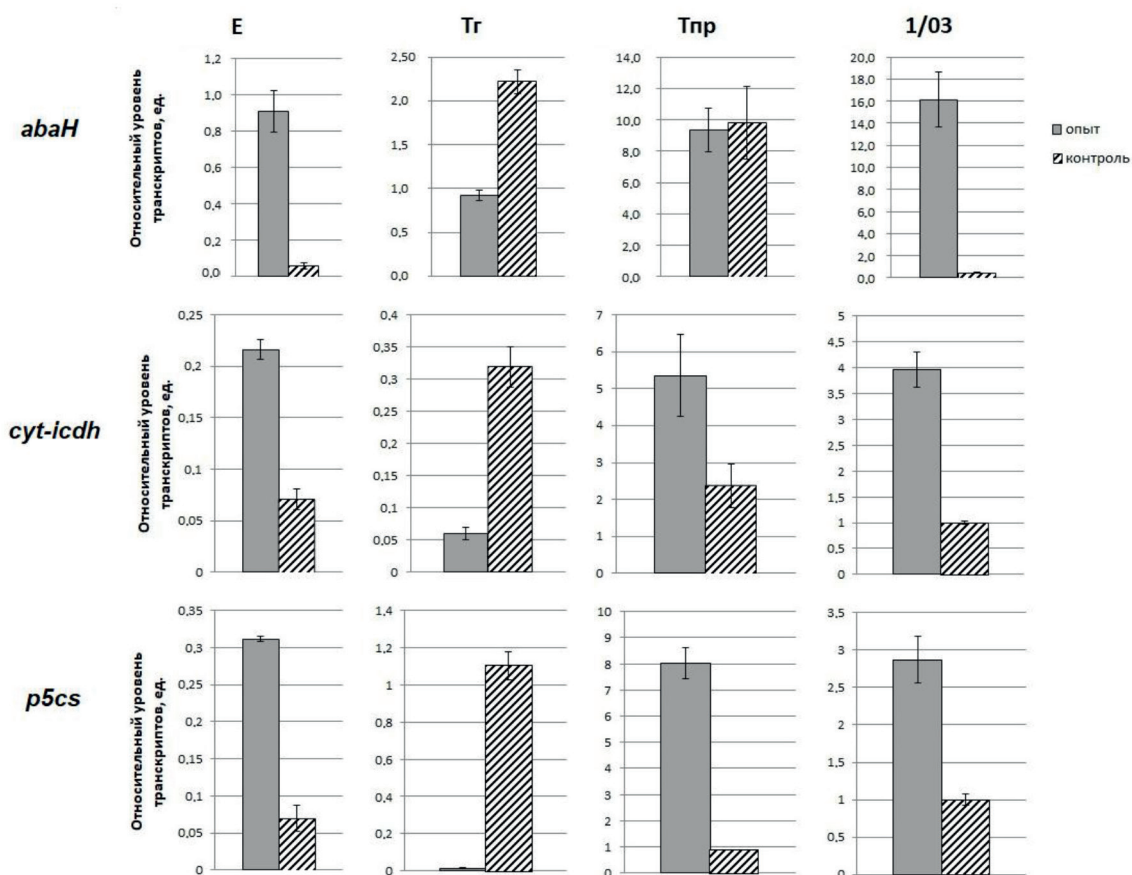


Рис. 1. Изменение экспрессии генов *abaH*, *cyt-icdh* и *p5cs* у клонов тополя Е, Тг, Тпр, 1/03 в условиях воздействия 1% NaCl

Активными механизмами приспособления к стрессу у растений являются изменение обмена веществ (возникновение метаболических приспособлений) или его торможение [32]. Снижение относительного уровня транскриптов генов *abaH*, *cut-icdh* и *p5cs* у образца тополя Тг может свидетельствовать об изменении общего метаболизма растения в сторону снижения скорости образования ферментов, отвечающих за развитие стрессовых реакций и торможении основного метаболизма как такового, что способствует развитию покоящегося состояния и является реакцией на воздействие солевого стресса.

Содержание АБК в растительном организме увеличивается в результате воздействия различных стрессовых факторов, таких как обезвоживание. Содержание АБК определяется балансом между его биосинтезом и катаболизмом. Когда поддерживаются высокие уровни АБК, активны как биосинтез АБК, так и катаболизм. Считается, что у растений АБК 8'-гидроксилирование играет доминирующую роль в катаболизме АБК. АБК 8'-гидроксилаза, как было показано, представляет собой цитохром P450. Ранее выявлено, что в условиях стресса, вызванного засухой, все гены CYP707A у растений арабидопсиса, кодирующие P450, были активированы, и при регидратации

наблюдалось значительное повышение уровня мРНК. В соответствии с анализом экспрессии, мутанты *sur707a2* демонстрировали значительное ингибирование в семенах и накапливали в 6 раз большее содержание АБК, чем дикий тип. Эти результаты показывают, что гены семейства CYP707A играют основную регуляторную роль в контроле уровня АБК в растениях [11].

Воздействие солевого стресса в нашем исследовании способствовало увеличению экспрессии гена *cut-icdh*, кодирующего цитозольную НАДФ-ИДГ. Из полученных результатов следует, что ИДГ может поставлять субстрат в виде 2-ОГ для синтеза и накопления глутамата ГДГ, который в дальнейшем используется на синтез пролина, что является реакцией на воздействие высоких концентраций соли.

Также в данном исследовании было показано, что экспрессия гена *p5cs* увеличивается у клонов Е, Тпр и 1/03 в ответ на воздействие солевого стресса, что свидетельствует о возрастающих процессах синтеза пролина у исследуемых объектов.

Для установления характера реакции исследуемых клонов тополя на воздействие солевого стресса был проведен анализ экспрессии генов транскрипционных факторов *DREB1*, *DREB2* и *NAC034* (рисунок 2).

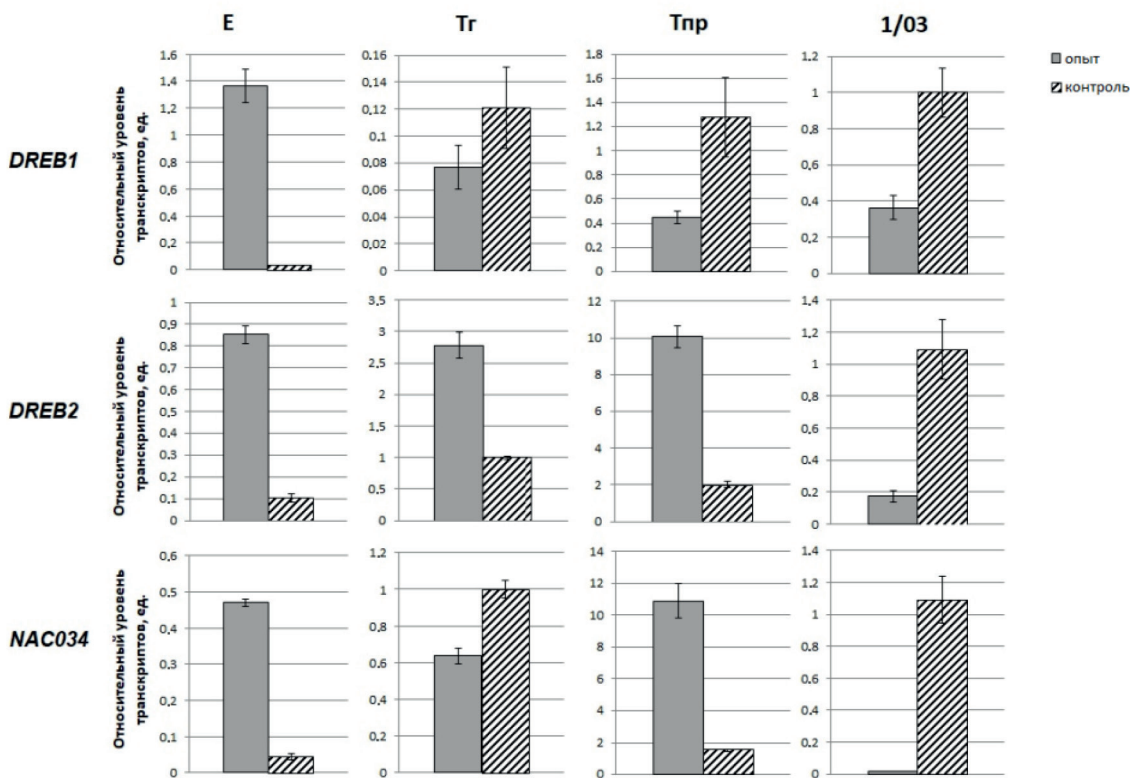


Рис. 2. Экспрессия генов DREB1, DREB2 и NAC034 после воздействия солевого стресса на клоны тополя Е, Тг, Тпр и 1/03

Установлено, что экспрессия гена *DREB1* значительно увеличивается у образцов клона Е, но снижается у остальных проанализированных образцов тополя (рисунок 2). Показано, что относительный уровень транскриптов гена *DREB2* увеличивается у трех из проанализированных образцов тополя. Так, у образцов тополя Е экспрессия увеличивается в 8.3 раза, тополя Тг – в 2.8 раз, тополя Тпр – в 5 раз относительно контрольных образцов. Для гена *NAC034* также наблюдается увеличение уровня транскриптов для образцов генотипов тополя Е – в 10.6 раз и Тпр – в 7.2 раза, и уменьшение для образцов Тг – в 0.6 раз (рисунок 2). Как видно из полученных данных, наибольшее изменение экспрессии большинства исследуемых генов наблюдается у образцов тополя Е, что может свидетельствовать о высокой способности адаптации данного триплоидного гибрида к солевому стрессу (значительное повышение экспрессии свидетельствует о пластичности регуляции синтеза белка, обеспечивающей возможность приспособления к стрессовым условиям). Ранее сообщалось, что сверхэкспрессия генов транскрипционных факторов из семейств DREB и NAC у трансгенных растений способствовала увеличению их устойчивости к воздействию солевого стресса [1, 2, 33].

Транскрипционные факторы объединены в различные семейства белков, которые регулируют экспрессию генов и передачу сигнала в ответ на абиотический стресс. Ранее проведенные, в том числе и геномные, исследования показали, что в индукции чувствительных к стрессу генов участвуют различные транскрипционные регуляторные системы. Известно, что несколько групп *цис*- и *транс*- факторов участвуют в транскрипции, являющейся ответом на действие стресса. Некоторые из них контролируются абсцизовой кислотой (АБК), а другие – нет, что свидетельствует об участии как АБК-зависимых, так и АБК-независимых регуляторных систем в регуляции экспрессии генов, чувствительных к стрессу. Одна и та же группа генов может индуцироваться различными типами стрессовых воздействий, таких как засуха и холод, что свидетельствует о наличии перекрестных путей между сигнальными механизмами [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании была проведена оценка экспрессии генов *abaH*, *cyt-icdh* и *p5cs*, генов транскрипционных факторов *DREB1*, *DREB2* и *NAC034* у образцов клонов Тг, Тпр, Е и 1/03 в

культуре *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровни экспрессии проанализированных генов могут являться маркерами ответа на воздействие солевого стресса у различных клонов тополя. У образцов Тг, Тпр и Е наблюдается увеличение экспрессии большинства исследуемых генов, что может свидетельствовать о развитии стрессоустойчивости у данных клонов. Снижение относительного уровня транскриптов генов *abaH*, *cyt-icdh* и *p5cs* у клонов Тг и генов транскрипционных факторов у образцов 1/03 может являться следствием проявления механизмов адаптации к воздействию солевого стресса вследствие торможения процессов метаболизма.

Анализ экспрессии генов транскрипционных факторов может использоваться в качестве метода оценки стрессоустойчивости у различных генотипов (в том числе, гибридов и сортов) тополя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen J., Xia X., Yin W. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009. Vol. 378. No. 3, pp. 483–487.
2. Lu X., Zhang X., Duan H., Lian C., Liu C., Yin W., Xia X. T // Physiologia plantarum. 2018. Vol. 162. No. 1, pp. 73–97.
3. Царев А.П. Сортоведение тополя. Воронеж, ВГУ, 1985, 152 с.
4. Левенко Б.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к стрессовым факторам: автореф. дис. докт. биол. наук: 03.00.15 / Б.А. Левенко. ИФРГ. К., 1991, 41 с.
5. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса, Астропринт, 2011, 224 с.
6. Munns R., James R.A. // Plant and Soil. 2003. Vol. 253, pp. 201–218.
7. Garthwaite A.J., Bothmer R. von, Colmer T.D. // Journal of Experimental Botany. 2005. Vol. 56, pp. 2365–2378.
8. Аминова Е.Ю., Гуреев А.П., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 1. С. 15–23.
9. Аминова Е.Ю., Табацкая Т.М., Машкина О.С. Патент на изобретение № 2691574 «Способ ранней диагностики деревьев сосны обыкновенной по признаку засухоустойчивости на основе показателя жизнеспособности каллусных культур *in vitro*». Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений РФ 14.06.2019.

10. Табацкая Т.М., Аминова Е.Ю., Машкина О.С. // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: материалы V международной научно-практической конференции, Симферополь, 5–9 октября 2020 г. Симферополь, ИТ «АРИАЛ», 2020, С. 190.
11. Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Nambara E. // The EMBO journal. 2004. Vol. 23. No. 7, pp. 1647–1656.
12. Zeevaart J.A.D., Creelman R.A. // Annual review of plant physiology and plant molecular biology. 1988. Vol. 39. No. 1, pp. 439–473.
13. Lutts S., Majerus V., Kinet J.M. // Physiologia Plantarum. 1999. Vol. 105. No. 3, pp. 450–458.
14. Wang Z.Q., Yuan Y.Z., Ou J.Q., Lin Q.H., Zhang C.F. // Journal of Plant Physiology. 2007. Vol. 164. No. 6, pp. 695–701.
15. Silva-Ortega C.O., Ochoa-Alfaro A.E., Reyes-Agüero, J.A., Aguado-Santacruz G.A., Jiménez-Bremont J.F. // Plant Physiology and Biochemistry. 2008. Vol. 46. No. 1, pp. 82–92.
16. Rini D.W.I.S. // Nusantara Bioscience. 2019. Vol. 11. No. 1, pp. 35–43.
17. Kim J.S., Mizoi J., Yoshida T., Fujita Y., Nakajima J., Otori T., Yamaguchi-Shinozaki K. // Plant Cell Physiol. 2011. No. 52 (12), pp. 2136–46.
18. Wu H. L., Li L., Cheng Z.C., Ge W., Gao J., Li X.P. // Genetics and Molecular Research. 2015. Vol. 14 (3), pp. 10206–10223.
19. Charfeddine M, Bouaziz D, Charfeddine S., Hammami A, Ellouz O.N. Bouzid R.G. // Plant Biotechnology Reports. 2015. Vol. 9. No. 2, P. 79–88.
20. Wang Z., Dane F. // Acta physiologiae plantarum. 2013. Vol. 35. No. 5, pp. 1397–1408.
21. Lu X., Dun H., Lian C., Zhang X., Yin W., Xia X. // Plant physiology and biochemistry. 2017. Vol. 115, pp. 418–438.
22. Шабанова Е.А., Внукова Н.И., Машкина О.С. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020. № 1. С. 42–49.
23. Gureev A.P., Mashkina O.S., Shabanova E.A., Vitkalova I.Yu., Sitnikov V.V., Popov V.N. // Plant Molecular Biology. 2021. Vol. 106. Iss. 6, pp. 479–89.
24. Машкина О.С., Федулова Т.П., Табацкая Т.М., Кондратьева А.М., Шабанова Е.А. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 2. С. 60–69.
25. Сиволапов А.И., Сиволапов В.А., Машкина О.С., Табацкая Т.М., Благодарова Т.А. Рекомендации по интенсивному выращиванию посадочного материала и созданию плантационных культур сортов тополя сереющего в Центрально-Черноземном районе. Воронеж, 2012. 35 с.
26. Сиволапов А.И. Тополь сереющий. Генетика, селекция, размножение. Воронеж: ВГУ, 2005. 157 с.
27. Аминова Е.Ю., Табацкая Т.М., Машкина О.С. Оценка солеустойчивости *Populus L.* в условиях моделируемого стресса *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. Сочи, 10–12 ноября 2021. Вып. 79. С. 60–66.
28. Табацкая Т.М., Аминова Е.Ю., Машкина О.С. // Сборник тезисов Международного Конгресса «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (18–22 июня, г. Санкт-Петербург), 2019. С. 919.
29. Табацкая Т.М., Аминова Е.Ю., Машкина О.С. // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: материалы V международной научно-практической конференции, Симферополь, 5–9 октября 2020 г. С. 190–191.
30. Chomczynski P., Sacchi N. // Analytical biochemistry. 1987. Vol. 162, No. 1, pp. 156–159.
31. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart, C.N. // BMC bioinformatics. 2006. V.7. №. 1. P. 1–12
32. Яковец О.Г. Фитофизиология стресса: курс лекций. Минск, БГУ, 2010, С. 11.
33. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. // Current opinion in plant biology. 2003. Vol. 6. No. 5, pp. 410–417.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

*Ржевский С. Г., младший научный сотрудник
E-mail: slavaosin@yandex.ru.

Гродецкая Т. А., младший научный сотрудник
E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru

All-Russian Research Institute of Forest Genetics,
Selection and Biotechnology

*Rzhevsky S. G., junior researcher
E-mail: slavaosin@yandex.ru.

Grodetskaia T. A., junior researcher
E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru

Аmineва Е. Ю., кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник
E-mail: elena.pardaeva@mail.ru

Amineva E. Y., PhD., Researcher
E-mail: elena.pardaeva@mail.ru

Федулова Т. П., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии.
E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Fedulova T. P., PhD., DSci., Leading Researcher, Laboratory of Biotechnology
E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Машкина О. С., кандидат биологических наук, заведующий лаборатории биотехнологии; доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета.
E-mail: mashkinaos@mail.ru

Mashkina O. S., PhD., Associate Professor. Head of the Laboratory of Biotechnology; Associate Professor, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University
E-mail: mashkinaos@mail.ru

Кондратьева А. М., к. б. н., старший научный сотрудник
E-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

Kondratyeva A. M., PhD., Senior Researcher of the Biochemistry
E-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

INFLUENCE OF SALT STRESS ON THE EXPRESSION OF *ABAH*, *CYT-ICDH*, *P5CS*, *DREB2*, *DREB1*, *NAC034* GENES OF POPLAR IN CULTURE *IN VITRO*

S. G. Rzhovsky¹, T. A. Grodetzkaya¹, E. Y. Amineva¹, T. P. Fedulova¹,
A. M. Kondratyeva¹, O.S. Mashkina^{1,2}

¹All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology
²Voronezh State University

Abstract. To solve the problems of selection in forestry, it is promising to use methods for determining the stress response at the genome level. In this case, microplants cultivated *in vitro* are convenient material for research. This article presents the results of evaluating the effect of salt stress on the expression of genes for abscisic acid and water-stress-inducible protein (*abaH*), isocitrate dehydrogenase (*cyt-icdh*), delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*p5cs*), genes of transcription factors *DREB2*, *DREB1*, *NAC034*, in *in vitro* cultured poplar genotypes. The objects of the study were samples of a hybrid of white poplar and aspen A.P. Tsarev breeding, white poplar, triploid hybrid of white poplar O.S. Mashkina breeding, and gray poplar Priyarsky produced by A.I. Sivolapov, subjected to salinization of the culture medium under *in vitro* conditions. It was found that the expression of the *abaH* gene increased in two samples, while the third showed a decrease in this indicator relative to the control, the fourth showed no changes in the expression of *abaH*. For the *cyt-icdh* gene, an increase in expression in experimental samples for the three analyzed genotypes was shown, the fourth sample showed a decrease in the relative level of transcripts of this gene. It was found that the expression of the *DREB1* gene significantly increased in samples of one clone, but decreased in the rest. The relative level of *DREB2* gene transcripts increases in three of the analyzed poplar samples, and decreases in one. For the *NAC034* gene, there is also an increase in the level of transcripts for two samples of poplar genotypes and a decrease for the other two. The results obtained indicate that the considered genes, analyzed for expression, can serve as markers of the response to the effects of salt stress.

In some of the samples involved, an increase in the expression of the studied genes is observed, which may indicate a high adaptive ability of these genotypes to stress conditions. A decrease in the relative level of transcripts of the *abaH*, *cyt-icdh*, *p5cs* and transcription factors genes in certain genotypes may also be a consequence of the development of adaptation mechanisms to the effects of salt stress due to inhibition of metabolic processes. Analysis of gene expression for transcription factors can be used as a method for assessing stress resistance in various poplar genotypes and varieties.

Keywords: poplar, salt stress, expression, *abaH*, *cyt-icdh*, *p5cs*, *DREB2*, *DREB1*, *NAC034*.

REFERENCES

1. Chen J., Xia X., Yin W., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, Vol. 378, No. 3, pp. 483–487.
2. Lu X., Zhang X., Duan H., Lian C., Liu C., Yin W., Xia X.T., Physiologia plantarum, 2018, Vol. 162, No. 1, pp. 73–97.
3. Carev A.P. Sortovedenie topolja. Voronezh, VGU, 1985, 152 p.
4. Levenko B.A. Kletochnaja selekcija rastenij na ustojchivost' k stressovym faktoram: avtoref. dis. dokt. biol. nauk: 03.00.15 / B.A. Levenko. IFRG. K., 1991. 41 p.
5. Ignatova S.A. Kletochnye tehnologii v raste-nievodstve, genetike i selekcii vozdeljvaemyh rastenij: zadachi, vozmozhnosti, razrabotki sistem in vitro. Odessa, Astroprint, 2011, 224 p.
6. Munns R., James R.A., Plant and Soil, 2003, Vol. 253, pp. 201–218.
7. Garthwaite A.J., Bothmer R. von, Colmer T.D., Journal of Experimental Botany, 2005, Vol. 56, pp. 2365–2378.
8. Amineva E.Ju., Gureev A.P., Tabackaja T.M., Mashkina O.S., Popov V.N., Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii, 2019, Vol. 23, No 1, pp. 15–23.
9. Amineva E.Ju., Tabackaja T.M., Mashkina O.S. Patent na izobretenie № 2691574 «Sposob rannej diagnostiki derev'ev sosny obyknovennoj po priznaku zasuhoustojchivosti na osnove pokazatelja zhiznesposobnosti kallusnyh kul'tur *in vitro*». Data gosudarstvennoj registracii v Gosudarstvennom re-estre izobretenij RF 14.06.2019.
10. Tabackaja T.M., Amineva E.Ju., Mashkina O.S., Sovremennoe sostojanie, problemy i perspektivy razvitija agrarnoj nauki: materialy V mezhdun-arodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, Simferopol', 5–9 oktjabrja 2020 g. Simferopol', IT "ARIAL", 2020, p. 190.
11. Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Nambara E., The EMBO journal, 2004, Vol. 23, No. 7, pp. 1647–1656.
12. Zeevaart J.A.D., Creelman R.A., Annual re-view of plant physiology and plant molecular biology, 1988, Vol. 39, No. 1, pp. 439–473.
13. Lutts S., Majerus V., Kinet J.M., Physiologia Plantarum, 1999, Vol. 105, No. 3, pp. 450–458.
14. Wang Z.Q., Yuan Y.Z., Ou J.Q., Lin Q.H., Zhang C.F., Journal of Plant Physiology, 2007, Vol. 164, No. 6, pp. 695–701.
15. Silva-Ortega C.O., Ochoa-Alfaro A.E., Reyes-Agüero, J.A., Aguado-Santacruz G.A., Jiménez-Bremont J.F., Plant Physiology and Biochemistry, 2008, Vol. 46, No. 1, pp. 82–92.
16. Rini D.W.I.S., Nusantara Bioscience, 2019, Vol. 11, No. 1, pp. 35–43.
17. Kim J.S., Mizoi J., Yoshida T., Fujita Y., Nakajima J., Ohori T., Yamaguchi-Shinozaki K., Plant Cell Physiol., 2011, No. 52 (12), pp. 2136–46.
18. Wu H.L., Li L., Cheng Z.C., Ge W., Gao J., Li X.P., Genetics and Molecular Research, 2015, Vol. 14 (3), pp. 10206–10223.
19. Charfeddine M., Bouaziz D., Charfeddine S., Hammami A, Ellouz O.N. Bouzid R.G., Plant Bio-technology Reports, 2015, Vol. 9, No. 2, P. 79–88.
20. Wang Z., Dane F., Acta physiologiae planta-rum, 2013, Vol. 35, No. 5, pp. 1397–1408.
21. Lu X., Dun H., Lian C., Zhang X., Yin W., Xia X., Plant physiology and biochemistry, 2017, Vol. 115, pp. 418–438.
22. Shabanova E.A., Vnukova N.I., Mashkina O.S., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija, 2020, No 1, pp. 42–49.
23. Gureev A.P., Mashkina O.S., Shabanova E.A., Vitkalova I.Yu., Sitnikov V.V., Popov V.N., Plant Molecular Biology, 2021, Vol. 106, Iss. 6, pp. 479–89.
24. Mashkina O.S., Fedulova T.P., Tabackaja T.M., Kondrat'eva A.M., Shabanova E.A., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija, 2016, No 2, pp. 60–69.
25. Sivolapov A.I., Sivolapov V.A., Mashkina O.S., Tabackaja T.M., Blagodarova T.A. Rekomendacii po intensivnomu vyrashhivaniju posadochnogo materiala i sozdaniju plantacionnyh kul'tur sortov topolja serejushhego v Central'no-Chernozemnom rajone. Voronezh, 2012, 35 p.
26. Sivolapov A.I. Topol' serejushhij. Genetika, selekcija, razmnozhenie. Voronezh: VGU, 2005, 157 p.

27. Tabackaja T.M., Amineva E.Ju., Mashkina O.S., Sbornik tezisov Mezhdunarodnogo Kongressa «VII Sjezd Vavilovskogo obshhestva genetikov i selekcionerov, posvjashhennyj 100-letiju kafedry genetiki SPbGU, i asociirovannye simpoziumy» (18–22 ijunja, g. Sankt-Peterburg), 2019, p. 919.
28. Tabackaja T.M., Amineva E.Ju., Mashkina O.S., Sovremennoe sostojanie, problemy i perspektivy razvitija agrarnoj nauki: materialy V mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii, Simferopol', 5–9 oktjabrja 2020 g, pp.190–191.
29. Amineva E.YU., Tabackaya T.M., Mashkina O.S. Ocenka soleustojchivosti *Populus L.* v usloviyah modeliruemogo stressa *in vitro*, Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo. Sochi, 10–12 noyabrya 2021. Vyp. 79, pp. 60–66.
30. Chomczynski P., Sacchi N., Analytical biochemistry, 1987, Vol. 162, No. 1, pp. 156–159.
31. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart, C.N., BMC bioinformatics, 2006., V.7. No. 1, pp. 1–12
32. Jakovec O.G. Fitofiziologija stressa: kurs lekcij. Minsk, BGU, 2010, p. 11.
33. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Current opinion in plant biology, 2003, Vol. 6, No. 5, pp. 410–417.